

WHAT IS CLAIMED IS:

1. 胚性幹細胞を非凝集状態で培養する工程を含む、胚性幹細胞を外胚葉細胞に分化誘導する方法。
2. 外胚葉細胞が、神経系細胞または表皮系細胞に分化しうる能力を有している細胞である、請求の範囲 1 に記載の方法。
3. 胚性幹細胞を非凝集状態で培養する工程を含む、胚性幹細胞を外胚葉由来の細胞に分化誘導する方法。
4. 外胚葉由来の細胞が、神経系細胞または表皮系細胞である、請求の範囲 3 に記載の方法。
5. 表皮系細胞が表皮細胞である、請求の範囲 4 に記載の方法。
6. 神経系細胞が以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲 4 に記載の方法。(a) 神経幹細胞 ;
(b) 神経細胞 ;
(c) 神経管の細胞 ;
(d) 神経堤の細胞。
7. 神経幹細胞が、ネスチンを発現している神経幹細胞である、請求の範囲 6 に記載の方法。

8. 神経細胞が、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれる神経細胞である、請求の範囲 6 に記載の方法。

- (a) ドーパミン作動性神経細胞；
- (b) アセチルコリン作動性神経細胞；
- (c) γ アミノ酪酸作動性神経細胞；
- (d) セロトニン作動性神経細胞。

9. アセチルコリン作動性神経細胞が、islet 1 を発現している運動神経細胞である、請求の範囲 8 に記載の方法。

10. 神経管の細胞が、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲 6 に記載の方法。

(a) 神経管の腹側化因子であるソニックヘッジホック (Sonic hedgehog) に反応し腹側に位置する細胞に分化し、かつ神経管の背側因子である骨形成因子 4 (Bone Morphogenetic Protein 4) に反応し背側に位置する細胞に分化する能力を有する、背腹軸が決定される前の段階の神経管の細胞；

(b) 神経管の最も腹側の底板に位置する HNF-3 β (Hepatocyte Nuclear Factor-3 β) を発現している神経管腹側の細胞；

(c) 神経管の腹側から HNF-3 β (Hepatocyte Nuclear Factor-3 β) について 2 番目に存在するマーカー Nkx2.2 を発現している神経管腹側の細胞；

(d) Pax-7 を発現している神経管背側の細胞。

11. 神経堤の細胞が、AP-2 (Activator Protein 2) を発現している細胞である、請求の範囲 6 に記載の方法。

12. 骨形成因子 4 (Bone Morphogenetic Protein 4) 存在下で培養することを特徴とする、請求の範囲 1～11 のいずれか 1 項に記載の方法。

13. ソニックヘッジホック (Sonic hedgehog) 存在下で培養することを特徴とする、請求の範囲 1～12 のいずれか 1 項に記載の方法。

14. 非凝集状態が、エンブリオイドボディを介さない状態である、請求の範囲 1～13 のいずれか 1 項に記載の方法。

15. 無血清培養の条件下で培養する工程を含むことを特徴とする、請求の範囲 1～14 のいずれか 1 項に記載の方法。

16. ストローマ細胞由来の因子の存在下で培養することを特徴とする、請求の範囲 1～15 のいずれか 1 項に記載の方法。

17. ストローマ細胞存在下で培養することを特徴とする、請求の範囲 1～16 のいずれか 1 項に記載の方法。

18. ストローマ細胞が、物理化学的处理により増殖能力を失ったストローマ細胞である、請求の範囲 17 に記載の方法。

19. 物理化学的处理が、以下の (a)、(b) および (c) からなる群から選ばれる処理である、請求の範囲 18 に記載の方法。

(a) 抗癌剤による処理；

(b) 放射線の照射による処理；

(c) 病理診断で用いられる組織固定のための処理。

20. 抗癌剤が、マイトマイシンC、5-フルオロウラシル、アドリアマイシンおよびメトトレキセートからなる群から選ばれる抗癌剤である、請求の範囲 19 に記載の方法。

21. 病理診断で用いられる組織固定のための処理が、マイクロウェーブ固定、急速凍結置換固定、グルタルアルデヒド固定、パラフォルムアルデヒド固定、ホルマリン固定、アセトン固定、ブアン固定、過ヨウ素酸固定、メタノール固定およびオスミウム酸固定からなる群から選ばれる処理である、請求の範囲 19 に記載の方法。

22. ストローマ細胞が、ハイブリドーマFERM BP-7573 が産生するモノクローナル抗体で認識されるストローマ細胞である請求の範囲 16～21 のいずれか 1 項に記載の方法。

23. ストローマ細胞が、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) および (g) からなる群から選ばれるストローマ細胞である、請求の範囲 16～22 のいずれか 1 項に記載の方法。

- (a) 胎児初代培養繊維芽細胞；
- (b) SIHMマウス由来STO細胞；
- (c) マウス胎児由来NIH/3T3 細胞；
- (d) M-CSF欠損マウス頭蓋冠由来OP9 細胞；
- (e) マウス頭蓋冠由来MC3T3-G2/PA6 細胞；
- (f) 胚性幹細胞由来のストローマ細胞；
- (g) 骨髓間葉系幹細胞由来のストローマ細胞。

24. 胚性幹細胞が、以下の (a)、(b) および (c) からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲 1～23 のいずれか 1 項に記載の方法。

- (a) 着床以前の初期胚を培養することによって樹立した胚性幹細胞；

	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025	2026	2027	2028	2029	2030	2031	2032	2033	2034	2035	2036	2037	2038	2039	2040	2041	2042	2043	2044	2045	2046	2047	2048	2049	2050	2051	2052	2053	2054	2055	2056	2057	2058	2059	2060	2061	2062	2063	2064	2065	2066	2067	2068	2069	2070	2071	2072	2073	2074	2075	2076	2077	2078	2079	2080	2081	2082	2083	2084	2085	2086	2087	2088	2089	2090	2091	2092	2093	2094	2095	2096	2097	2098	2099	2100	2101	2102	2103	2104	2105	2106	2107	2108	2109	2110	2111	2112	2113	2114	2115	2116	2117	2118	2119	2120	2121	2122	2123	2124	2125	2126	2127	2128	2129	2130	2131	2132	2133	2134	2135	2136	2137	2138	2139	2140	2141	2142	2143	2144	2145	2146	2147	2148	2149	2150	2151	2152	2153	2154	2155	2156	2157	2158	2159	2160	2161	2162	2163	2164	2165	2166	2167	2168	2169	2170	2171	2172	2173	2174	2175	2176	2177	2178	2179	2180	2181	2182	2183	2184	2185	2186	2187	2188	2189	2190	2191	2192	2193	2194	2195	2196	2197	2198	2199	2200	2201	2202	2203	2204	2205	2206	2207	2208	2209	2210	2211	2212	2213	2214	2215	2216	2217	2218	2219	2220	2221	2222	2223	2224	2225	2226	2227	2228	2229	2230	2231	2232	2233	2234	2235	2236	2237	2238	2239	2240	2241	2242	2243	2244	2245	2246	2247	2248	2249	2250	2251	2252	2253	2254	2255	2256	2257	2258	2259	2260	2261	2262	2263	2264	2265	2266	2267	2268	2269	2270	2271	2272	2273	2274	2275	2276	2277	2278	2279	2280	2281	2282	2283	2284	2285	2286	2287	2288	2289	2290	2291	2292	2293	2294	2295	2296	2297	2298	2299	2300	2301	2302	2303	2304	2305	2306	2307	2308	2309	2310	2311	2312	2313	2314	2315	2316	2317	2318	2319	2320	2321	2322	2323	2324	2325	2326	2327	2328	2329	2330	2331	2332	2333	2334	2335	2336	2337	2338	2339	2340	2341	2342	2343	2344	2345	2346	2347	2348	2349	2350	2351	2352	2353	2354	2355	2356	2357	2358	2359	2360	2361	2362	2363	2364	2365	2366	2367	2368	2369	2370	2371	2372	2373	2374	2375	2376	2377	2378	2379	2380	2381	2382	2383	2384	2385	2386	2387	2388	2389	2390	2391	2392	2393	2394	2395	2396	2397	2398	2399	2400	2401	2402	2403	2404	2405	2406	2407	2408	2409	2410	2411	2412	2413	2414	2415	2416	2417	2418	2419	2420	2421	2422	2
--	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	---

33. 胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する活性を有するストローマ細胞または該細胞由来の因子を有効成分として含む、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞への分化誘導剤。

34. ストローマ細胞が、請求の範囲 18～23 のいずれか 1 項に記載のストローマ細胞である、請求の範囲 33 に記載の分化誘導剤。

35. ストローマ細胞由来の因子がムコ多糖吸着能を有する、請求の範囲 33 または 34 に記載の分化誘導剤。

36. ムコ多糖がヘパリンである、請求の範囲 35 に記載の分化誘導剤。

37. 胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する活性を有するストローマ細胞を、ムコ多糖を含む培地中で培養して得られる培養上清を含む培地。

38. ストローマ細胞が、請求の範囲 18～23 のいずれか 1 項に記載のストローマ細胞である、請求の範囲 37 に記載の培養上清を含む培地。

39. ムコ多糖がヘパリンである、請求の範囲 37 または 38 に記載の培養上清を含む培地。

40. 請求の範囲 37～39 のいずれか 1 項に記載の培養上清を有効成分として含む、外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞の分化誘導剤。

41. ストローマ細胞を免疫原として用いることを特徴とする、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する活性を有するストローマ細胞を特異的に認識する抗体を取得する方法。

42. ストローマ細胞が、請求の範囲 18～23 のいずれか 1 項に記載のストロ
ーマ細胞である、請求の範囲 41 に記載の方法。

43. 請求の範囲 41 または 42 に記載の方法により取得される、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有するストローマ細胞を特異的に認識する抗体。

44. ハイブリドーマFERM BP-7573 が産生するモノクローナル抗体。

45. 請求の範囲 43 または 44 に記載の抗体を用いることを特徴とする、該抗体が認識する抗原を取得する方法。

46. 請求の範囲 45 に記載の方法により取得される、請求の範囲 43 または 44 に記載の抗体が認識する抗原。

47. 請求の範囲 46 に記載の抗原を含む細胞培養のための培地。

48. 胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を指標に、胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞へ分化誘導する活性を有するストローマ細胞由来の因子を取得する方法。

49. ムコ多糖とストローマ細胞由来の因子とを結合させる工程と、ムコ多糖に結合した該ストローマ細胞由来の因子から該因子を回収する工程を含む、請求の範囲 48 に記載の方法。

50. ストローマ細胞が、請求の範囲 18～23 のいずれか 1 項に記載のストローマ細胞である、請求の範囲 48 または 49 に記載の方法。

51. ムコ多糖が、ヘパリンである、請求の範囲 49 に記載の方法。

52. 請求の範囲 1～27 のいずれか 1 項に記載の方法を用いることによって誘導される、外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞。

53. 請求の範囲 52 に記載の外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞を、抗癌剤を含む培地中で培養する工程を含むことを特徴とする、胚性幹細胞から分化誘導された細胞の純度を高める方法。

54. 抗癌剤が、マイトマイシンC、5-フルオロウラシル、アドリアマイシン、メトトレキセートおよびアラCからなる群から選ばれる抗癌剤である、請求の範囲 53 に記載の方法。

55. 請求の範囲 53 または 54 に記載の方法を用いて得られる細胞。

56. 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、請求の範囲 1～27 のいずれか 1 項に記載の方法を行い、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞までの分化過程を比較することを特徴とする、胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞までの分化過程における調節に関連する物質の評価方法。

57. 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、請求の範囲 1～27 のいずれか 1 項に記載の方法を行い、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞までの分化過程を比較することを特徴とする、胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞までの分化過程における調節に関連する物質のスクリーニング方法。

58. 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、請求の範囲 52 に記載の細胞を培養し、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞の機能を比較することを特徴とする、外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞の機能の調節に関連する物質の評価方法。

59. 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、請求の範囲 52 に記載の細胞を培養し、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞の機能を比較することを特徴とする、外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞の機能の調節に関連する物質のスクリーニング方法。

60. 胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有するストローマ細胞または該細胞由来の因子を含む医薬。

61. ストローマ細胞が、請求の範囲 18～23 のいずれか 1 項に記載のストローマ細胞である、請求の範囲 60 に記載の医薬。

62. 因子がムコ多糖吸着能を有する、請求の範囲 60 に記載の医薬。

63. ムコ多糖がヘパリンである、請求の範囲 62 に記載の医薬。

64. 請求の範囲 43 または 44 に記載の抗体を含む医薬。
65. 請求の範囲 46 に記載の抗原を含む医薬。
66. 請求の範囲 52 または 55 に記載の細胞を含む医薬。
67. 外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患の診断、予防および／または治療のための医薬である、請求の範囲 60～66 のいずれか 1 項に記載の医薬。
68. 外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患が、神経系細胞または表皮系細胞の障害に基づく疾患である、請求の範囲 67 に記載の医薬。
69. 神経系細胞の障害に基づく疾患が、アルツハイマー病、ハンチントン舞踏病、パーキンソン病、虚血性脳疾患、てんかん、脳外傷、背堆損傷、運動神経疾患、神経変性疾患、網膜色素変性症、内耳性難聴、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、または神経毒物の障害に起因する疾患であり、表皮系細胞の障害に基づく疾患が火傷、外傷、創傷治癒、床擦れ、または乾せんである、請求の範囲 68 に記載の医薬。
70. 請求の範囲 43 または 44 に記載の抗体を用いることを特徴とする、請求の範囲 46 に記載の抗原の免疫学的検出法。
71. 請求の範囲 43 または 44 に記載の抗体を用いることを特徴とする、請求の範囲 46 に記載の抗原の免疫組織染色法。